

PCT

WELTOORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



<p>(51) Internationale Patentklassifikation 5 : A61K 31/00, 31/52</p>		<p>A1</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 93/19742 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 14. Oktober 1993 (14.10.93)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP93/00827</p>		<p>(74) Anwalt: WEISERT, Annekäte; Kraus, Weisert & Partner, Thomas-Wimmer-Ring 15, D-80539 München 22 (DE).</p>	
<p>(22) Internationales Anmeldedatum: 2. April 1993 (02.04.93)</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p>	
<p>(30) Prioritätsdaten: P 42 11 239.7 3. April 1992 (03.04.92) DE</p>		<p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i></p>	
<p>(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): MAX- PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; Bunsenstraße 10, D-3400 Göttingen (DE).</p>			
<p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): PODZUWEIT, Thomas [DE/DE]; Liebigstraße 10, D-6350 Bad Nauheim (DE).</p>			
<p>(54) Titel: MEDICAMENT AGAINST CARDIAC CIRCULATORY DISEASES</p>			
<p>(54) Bezeichnung: ARZNEIMITTEL GEGEN HERZ-KREISLAUF-ERKRANKUNGEN</p>			
<p>(57) Abstract</p> <p>A medicament contains one or several inhibitors of the cGMP-stimulated phosphodiesterase (PDE II), together with usual excipients and/or dilutants. The medicament preferably contains erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)-adenine or 2-o-propoxyphenyl-8-azapurin-6-one, if necessary together with one or several activators of the guanylylcase. Also disclosed is the use of inhibitors of the cGMP-stimulated phosphodiesterase for controlling and preventing cardiac circulatory diseases and for producing medicaments against cardiac circulatory diseases. Erythro-4-(2-hydroxy-3-nonyl)-adenine or 2-o-propoxyphenyl-8-azapurin-6-one are preferably used, if necessary together with one or several activators of the guanylylcase.</p>			
<p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die Erfindung betrifft ein Arzneimittel, das einen oder mehrere Inhibitoren für die cGMP-stimulierte Phosphodiesterase (PDE II) zusammen mit üblichen Trägerstoffen und/oder Verdünnungsmitteln enthält. Bevorzugt enthält das Arzneimittel Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)-adenin oder 2-o-Propoxyphenyl-8-azapurin-6-on, gegebenenfalls zusammen mit einem oder mehreren Aktivatoren der Guanylylcase. Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung von Inhibitoren der cGMP-stimulierten Phosphodiesterase für die Bekämpfung und Prophylaxe von Herz-Kreislauf-Erkrankungen und für die Herstellung von Arzneimitteln gegen Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Bevorzugt werden Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)-adenin oder 2-o-Propoxyphenyl-8-azapurin-6-on verwendet, gegebenenfalls zusammen mit einem oder mehreren Aktivatoren der Guanylylcase.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
AU	Australien	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbados	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BE	Belgien	GN	Guinea	NO	Norwegen
BP	Burkina Faso	GR	Griechenland	NZ	Neuseeland
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	PL	Polen
BJ	Benin	IE	Irland	PT	Portugal
BR	Brasilien	IT	Italien	RO	Rumänien
CA	Kanada	JP	Japan	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SD	Sudan
CC	Kongo	KR	Republik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KZ	Kasachstan	SK	Slowakischen Republik
CI	Côte d'Ivoire	LJ	Liechtenstein	SN	Senegal
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	SU	Soviet Union
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TD	Tschad
CZ	Tschechischen Republik	MC	Mongaco	TC	Togo
DE	Deutschland	MG	Madagaskar	UA	Ukraine
DK	Dänemark	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
ES	Spanien	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Beschreibung

Arzneimittel gegen Herz-Kreislauf-Erkrankungen

Die Erfindung betrifft ein Arzneimittel gegen Herz-Kreislauf-Erkrankungen, insbesondere gegen Herzrhythmusstörungen, Herzinsuffizienz, Myokardischämie, Angina pectoris und Bluthochdruck (Hypertonie), das einen speziellen Inhibitor enthält, und die Verwendung des speziellen Inhibitors.

Herz-Kreislauf-Erkrankungen gehören zu den Haupttodesursachen in den Industriestaaten. Ist das Herz nicht mehr imstande, eine den Anforderungen entsprechende Förderleistung zu erbringen, d.h. hat es nicht mehr die Kraft, die dem venösen Angebot entsprechende Blutmenge in die Kreislaufperipherie zu pumpen, so spricht man von Herzinsuffizienz. Man unterscheidet dabei nach dem betroffenen Herzteil eine Rechtsherzinsuffizienz, Linksherzinsuffizienz und beidseitige Insuffizienz (Globalinsuffizienz), je nach dem Schweregrad eine Ruhe- bzw. Belastungsinsuffizienz. Eine Herzinsuffizienz kann mechanische oder biochemische Ursachen haben. Eine mechanisch bedingte Herzinsuffizienz ist möglich durch langdauernde Überbelastung des Myokards infolge erhöh-

ten Widerstands im kleinen oder großen Kreislauf (z.B. bei chronischen Lungenerkrankungen, Mitral- oder Aortenstenose, Hypertonie), durch Ausfall von Herzmuskelfasern bei Myokarditis oder Herzinfarkt, Herzrhythmusstörungen (Tachykardie, Bradykardie) oder Behinderung der Herztätigkeit durch konstriktive Perikarditis oder Herzbeuteltamponade. Eine biochemisch bedingte Herzinsuffizienz tritt auf bei Substratmangel im Herzmuskel infolge ungenügender Durchblutung (Koronarinsuffizienz) oder gestörter Diffusion von den Kapillaren in die Muskelfasern (z.B. bei Myokarditis) und durch mangelhafte Umwandlung von chemischer Energie in mechanische Energie infolge einer Elektrolyt- oder Stoffwechselstörung (Verschiebung des K/Ca-Quotienten, Vitamin-B₁-Mangel, Diabetes mellitus).

Die medikamentöse Therapie der Herzinsuffizienz hat vor allem zum Ziel, die Herzarbeit zu ökonomisieren und die Kontraktionskraft der Herzmuskelfasern zu erhöhen.

Besondere Aufmerksamkeit gilt dabei den Herzrhythmusstörungen, unter denen bereits junge Menschen leiden können, die aber insbesondere für ältere Menschen typisch sind. Die pathologischen Veränderungen, die den Herzrhythmusstörungen unterliegen, beruhen auf einer Störung der Erregungsbildung und/oder der Erregungsleitung. Die Herzfrequenz kann dabei zu hoch (Tachykardie), zu niedrig (Bradykardie) oder unregelmäßig (Arrhythmie) sein.

Kammerflimmern ist oft die Ursache des plötzlichen Herztods. Zunehmende Bedeutung gewinnen biochemische Faktoren in der Genese solcher Arrhythmien. Aber der genaue Ursprung des Kammerflimmerns bleibt spekulativ, und eine wirksame Therapie mit Arzneimitteln ist immer noch nicht bekannt. Gemäß einer Hypothese wird die lokale Kaliumionenkonzentration, die aus dem Herzen freigesetzt wird, mit dem Einsetzen der

Arrhythmien und des Kammerflimmerns in Bezug gesetzt, aber der Verlust an Kaliumionen und das Kammerflimmern stehen manchmal in keinem Zusammenhang zueinander. Es wurde vorgeschlagen, daß cyclisches Adenosinmonophosphat, der Second Messenger der Katecholaminaktivität, einen Bezug zu dem Einsetzen des Kammerflimmerns hat.

Physiologische Mechanismen, die die Synthese oder den Abbau von cAMP in ischaemischen Zellen regulieren, sollten daher für die Entwicklung eines Arzneimittels gegen Kammerflimmern von Bedeutung sein (T. Podzuweit, W.F. Lubbe und L.H. Opie, Lancet i, 341 - 342, 1976).

Bei Schweinen wurde gefunden, daß frühe ventrikuläre Arrhythmien und das Kammerflimmern, die durch Verschlüsse der Koronararterien hervorgerufen wurden, im Zusammenhang mit erhöhten Spiegeln an myokardialem cAMP ebenso wie an Adenosin stehen. Zusätzlich wurde eine Beziehung zwischen den cAMP- und Adenosingehalten des ischaemischen Myokards und der Häufigkeit des Reperfusionskammerflimmerns nachgewiesen. Kammerflimmern, das durch den proximalen Verschluß des Ramus inter ventricularis anterior (Riva) der linken Herzkranzarterie hervorgerufen wurde, wurde durch Vorbehandlung der Schweine mit Atenolol (0,2 bis 1,0 mg/kg i.v.) nicht verhindert.

Cyclische Nukleotide wirken als Second Messenger in der hormonellen Regulation des Zellstoffwechsels. Verschiedene Hormone wirken über ein in der Membran der Rezeptorzelle lokalisiertes Enzymsystem, die Adenylzyklase, welche ATP in cAMP umwandelt. Das cAMP aktiviert eine oder mehrere Proteinkinasen dieser Zelle, welche ihrerseits die ATP-abhängige Phosphorylierung wichtiger Schlüsselenzyme des Intermediärstoffwechsels sowie die Phosphorylierung von membranständigen Proteinen katalysieren. Für die Entstehung der Arrhythmien

ist wichtig, daß die Aktivität bestimmter Kalziumkanäle durch eine cAMP-abhängige Phosphorylierung gesteuert wird. Die Phosphorylierung von Ca^{2+} -Kanälen (bzw. von einem mit diesen eng assoziierten Protein) durch cAMP-abhängige Proteinkinasen führt zu einer Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit dieser Ca^{2+} -Kanäle. Die Aufhebung des jeweils durch cAMP provozierten Effekts geschieht durch den wiederum steuerbaren Abbau des cAMPs durch eine spezifische Phosphodiesterase. Analog wird cGMP durch das Enzym Guanylzyklase synthetisiert und durch Phosphodiesterasen abgebaut.

Vier lösliche Phosphodiesterasen wurden aus Extrakten des menschlichen Papillarmuskels unter Verwendung von Anionenaustauschchromatographie isoliert. Diese Enzymaktivitäten wurden als PDE I bis IV nach ihrer Reihenfolge der Elution mit einem ansteigenden Salzgradienten (NaOAc bzw. NaCl) bezeichnet (T. Podzuweit et al., J. Mol. Cell. Cardiol. 23, Supplement V, 1991, Abstract P217).

Obwohl die Primärsequenzen von mehr als 15 verschiedenen cyclischen Nukleotid-Phosphodiesterasen von Säugern bekannt sind, wurde bisher kein Inhibitor, der zwischen Mitgliedern der gleichen Familie unterscheidet, entwickelt (J.A. Beavo und D.H. Reifsnyder, TiPS, Reviews, April 1990, Band 11, Seiten 150 bis 155).

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Inhibitoren bereitzustellen, die verschiedene zyklische Nukleotidphosphodiesterase-Isoenzyme selektiv hemmen können. Insbesondere soll ein Inhibitor für die cGMP-stimulierte Phosphodiesterase (PDE II) zur Verfügung gestellt werden. Erfindungsgemäß soll ein Arzneimittel zur Verfügung gestellt werden, das zur Behandlung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen geeignet ist. Weiterhin soll die Verwendung der Inhibitoren für die cGMP-stimulierte Phosphodiesterase (PDE II) für die

Bekämpfung und Prophylaxe von Herz-Kreislauf-Erkrankungen und für die Herstellung von Arzneimitteln gegen Herz-Kreislauf-Erkrankungen zur Verfügung gestellt werden. Außerdem sollen Aktivatoren der Guanylzyklase zur Verfügung gestellt werden, durch die die Wirkung der Inhibitoren verstärkt wird.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß Inhibitoren der cGMP-stimulierten Phosphodiesterase (PDE II) starke Antiarrhythmika sind, deren Wirkung durch Aktivatoren der Guanylzyklase verstärkt werden kann. Im einzelnen wurde nachgewiesen, daß der bekannte Adenosindeaminaseinhibitor EHNA (Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)-adenin) und 2-o-Propoxypyphenyl-8-azapurin-6-on starke Antiarrhythmika und selektive Hemmstoffe der cGMP-stimulierten PDE II sind. Die Effekte von EHNA wurden in der Vergangenheit über die Hemmung der Adenosindeaminase erklärt. Die Erfindung zeigt nun erstmals am Beispiel der Arrhythmien, daß die Wirkung von EHNA und von 2-o-Propoxypyphenyl-8-azapurin-6-on auf der selektiven Hemmung der cGMP-stimulierten PDE II beruht, eventuell im Zusammenwirken mit der Hemmung der Adenosindeaminase.

Die Erfindung betrifft ein Arzneimittel, das dadurch gekennzeichnet ist, daß es einen oder mehrere Inhibitoren für die cGMP-stimulierte Phosphodiesterase (PDE II) zusammen mit üblichen Trägerstoffen und/oder Verdünnungsmitteln enthält. Bevorzugt enthält das erfindungsgemäße Arzneimittel als Inhibitor Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)-adenin (EHNA) oder 2-o-Propoxypyphenyl-8-azapurin-6-on, gegebenenfalls zusammen mit einem oder mehreren Aktivatoren der Guanylzyklase.

Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung von Inhibitoren der cGMP-stimulierten Phosphodiesterase (PDE II), insbesondere von Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)-adenin (EHNA) oder 2-o-Propoxypyphenyl-8-azapurin-6-on für die Bekämpfung

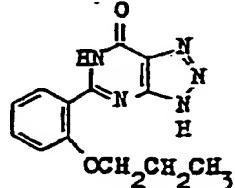
- 6 -

und Prophylaxe von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, insbesondere von Rhythmusstörungen, Herzinsuffizienz, Myokardischämie, Angina pectoris und Bluthochdruck (Hypertonie), und zur Herstellung von Arzneimitteln gegen Herz-Kreislauf-Erkrankungen, insbesondere gegen Herzrhythmusstörungen, Herzinsuffizienz, Myokardischämie, Angina pectoris und Bluthochdruck (Hypertonie), gegebenenfalls zusammen mit einem oder mehreren Aktivatoren der Guanylzyklase.

Die Erfindung betrifft ebenfalls einen Inhibitor für die cGMP-stimulierte Phosphodiesterase (PDE II), insbesondere Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)-adenin oder 2-o-Propoxyphenyl-8-azapurin-6-on zur Verwendung bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen, insbesondere bei Herzrhythmusstörungen, Herzinsuffizienz, Myokardischämie, Angina pectoris und Bluthochdruck (Hypertonie), gegebenenfalls zusammen mit einem oder mehreren Aktivatoren der Guanylzyklase.

EHNA ist im Handel erhältlich und kann beispielsweise von Sigma Chemie GmbH, Grünwalder Weg 30, 8024 Deisenhofen bezogen werden.

Das 2-o-Propoxyphenyl-8-azapurin-6-on der folgenden Strukturformel



kann nach Literaturangaben hergestellt werden (vgl. beispielsweise B.J. Broughton et al., J. Med. Chem. 18 (II), 1117). Der systematische Name dieser Verbindung lautet 1,4-Dihydro-5-(2-propoxyphenyl)-7H-1,2,3-triazolo[4,5-d]pyrimidin-7-on). Die Verbindung ist ein farbloses Pulver und in Wasser nur gering löslich. Sie löst sich in Aceton und

- 7 -

Ethanol und in schwach basischen Lösungen. Die Verbindung ist stabil und besitzt niedrige Toxizität. Die akute orale LD₅₀ bei der Maus, der Ratte und dem Kaninchen liegt im Bereich von 1.400 bis 2.000 mg/kg pro Anion.

Als Guanylzyklase-Aktivator können erfundungsgemäß alle solche Verbindungen, von denen diese Aktivität bekannt ist, verwendet werden. Beispiele hierfür sind Nitrite, organische Nitrate, Nitrosoverbindungen und eine Vielzahl anderer Stickstoffoxid enthaltender Substanzen einschließlich Natriumnitroprussid. Diese Verbindungen sind bekannt und werden beispielsweise in Goodman and Gilman's, The Pharmacological Basis of Therapeutics, 7. Auflage, 1985, Seite 798 und insbesondere Seite 806 in dem Kapitel "Drugs used for the treatment of angina: organic nitrates, calcium channel blockers, and β -adrenergic antagonists" beschrieben.

Unter den Aktivatoren der Guanylzyklase sind bevorzugt organische Nitrate wie Nitroglyzerin, Isosorbitdinitrat, Erythrityltetranitrat und Pentaerythrit, Tetranitrat, stickstoffidenthaltende Vasodilatatoren, die sogenannten Nitrovasodilatatoren, sowie das atriale natriuretische Peptid (ANP = ANF) und Bradykinin, das EDRF (Endothelium derived relaxing factor) aus der Gefäßwand freisetzt. Dieses EDRF ist identisch mit dem NO-Radikal, das z.B. aus Nitroprussid freigesetzt wird.

Erfundungsgemäß erfolgt die Verabreichung der Inhibitoren alleine oral, beispielsweise in Form von Tabletten, Dragees, Kapseln, Lösungen, oder intraperitoneal, intramuskulär, subkutan, intraartikulär oder intravenös, beispielsweise durch Injektion oder Infusion. Es ist besonders bevorzugt, daß das erfundungsgemäße Arzneimittel bzw. die erfundungsgemäße Verwendung so erfolgt, daß der Wirkstoff verzögert freigesetzt wird, das heißt als Depotformen. Die im folgenden gemachten

Ausführungen über das erfindungsgemäße Arzneimittel betreffen ebenfalls die erfindungsgemäße Verwendung. Das erfindungsgemäße Arzneimittel ist für Herz-Kreislauf-Erkrankungen, insbesondere Herzrhythmusstörungen, Herzinsuffizienz, Myokardischämie, Angina pectoris und Bluthochdruck (Hypertonie) geeignet. Das erfindungsgemäße Arzneimittel eignet sich zur Unterdrückung ischämiebedingter Arrhythmien,

- (1) über primäre antiarrhythmische Wirkung, und
- (2) dadurch, daß es eine antiischämische Wirkung hat, d.h. daß es vasodilatierend wirkt.

Weiterhin zeigt das erfindungsgemäße Arzneimittel keine zu starke positive Inotropie und entlastet dadurch das Herz. Wegen der vasodilatierenden Wirkung des erfindungsgemäßen Arzneimittels eignet sich dieses auch zur Behandlung der Hypertonie und der Angina pectoris. Wesentlich ist hier die synergistische Wirkung von organischen Nitraten und dem PDE-II-Inhibitor. Die mit Nitraten beobachtete Tachyphylaxie könnte durch EHNA günstig beeinflußt werden.

Einheitsdosen können beispielsweise 1 bis 4 mal täglich verabreicht werden. Die exakte Dosis hängt vom Verabreichungsweg und dem zu behandelnden Zustand ab. Naturgemäß kann es erforderlich sein, Routinevariationen der Dosis je nach dem Alter und dem Gewicht des Patienten sowie der Schwere des zu behandelnden Krankheitszustandes vorzunehmen.

Die erfindungsgemäßen Arzneimittel ohne Aktivatoren der Guanylyklase können in an sich bekannter Weise unter Verwendung eines oder mehrerer pharmazeutisch annehmbarer Träger oder Verdünnungsmittel formuliert werden. Die Zubereitungen können für die orale Verabreichung oder in einer für die

Verabreichung durch Injektion oder Infusion geeigneten Weise formuliert werden.

Werden erfindungsgemäß ein PDE-II-Inhibitor und ein Aktivator der Guanylzyklase verwendet, kann die Verwendung gleichzeitig, getrennt oder zeitlich abgestuft erfolgen. Beispielsweise kann das Arzneimittel gleichzeitig einen PDE-II-Inhibitor und einen Aktivator der Guanylzyklase enthalten. Es ist jedoch auch möglich, daß das Arzneimittel nur den PDE-II-Inhibitor enthält, und daß der Aktivator der Guanylzyklase getrennt, gleichzeitig oder zeitlich abgestuft verabreicht wird. Die Verabreichungswege für den Inhibitor und den Aktivator der Guanylzyklase können sich unterscheiden. Beispielsweise kann der Inhibitor subkutan oder durch Injektion oder Infusion verabreicht werden, und der Aktivator der Guanylzyklase kann beispielsweise durch Inhalation oder als Spray verabreicht werden. Der Inhibitor und der Aktivator der Guanylzyklase können somit jeweils auf unterschiedliche Weise kombiniert sein.

Die pharmazeutischen Zubereitungen für die orale Verabreichung können in Form von beispielsweise Tabletten oder Kapseln, die nach an sich bekannten Verfahren mit pharmazeutisch annehmbaren Verdünnungsmitteln, wie Bindemitteln (zum Beispiel vorgelatinierter Maisstärke, Polyvinylpyrrolidon oder Hydroxypropylmethylcellulose), Füllstoffen (zum Beispiel Lactose, Saccharose, Mannit, Maisstärke, mikrokristalline Cellulose oder Calciumhydrogenphosphat); Schmiermitteln (zum Beispiel Stearinsäure, Polyethylenglykol, Magnesiumstearat, Talk oder Siliciumdioxid); Desintegrationsmitteln (zum Beispiel Kartoffelstärke, Natriumstärkeglykolat oder Natriumcarboxymethylcellulose); oder Benetzungsmitteln (zum Beispiel Natriumlaurylsulfat), hergestellt werden, vorliegen. Die Tabletten können nach an sich bekannten Verfahren überzogen werden. Flüssige Zubereitungen für die orale Ver-

abreichung können in Form von beispielsweise wässrigen oder ölichen Lösungen, Sirupen, Elixieren, Emulsionen oder Suspensionen vorliegen, oder sie können als Trockenprodukt für die Konstitution mit Wasser oder einem anderen geeigneten Träger vor der Verwendung vorliegen. Solche flüssigen Zubereitungen können nach an sich bekannten Verfahren mit pharmazeutisch annehmbaren Zusatzstoffen hergestellt werden, wie Suspensionsmitteln (zum Beispiel Sorbitsirup, Cellulosederivaten, Glucose/Zucker-Sirup, Gelatine, Aluminiumstearatgel oder hydrierten genießbaren Fetten); Emulgiermitteln (zum Beispiel Lecithin, Gummi arabicum oder Sorbitan-monooleat); nichtwässrigen Trägern (zum Beispiel Mandelöl, ölichen Estern, Ethylalkohol oder fraktionierten Pflanzenölen); und Konserverungsmitteln (zum Beispiel Methyl- oder Propyl-p-hydroxybenzoaten oder Sorbinsäure). Die flüssigen Zubereitungen können auch an sich bekannte Puffer, Geschmacks- bzw. Aromamittel, Farbstoffe und Süßstoffe, je nach Bedarf, enthalten.

Für die parenterale Verabreichung können die Verbindungen für Injektion, bevorzugt intravenöse, intramuskuläre oder subkutane Injektion oder Infusion formuliert werden. Zubereitungen für die Injektion können in Eindosenform, zum Beispiel in Ampullen, oder in Mehrfachdosis-Behältern mit einem zugegebenen Konservierungsstoff vorliegen. Die Zubereitungen können in Form von Suspensionen, Lösungen oder Emulsionen in ölichen oder wässrigen Trägern vorliegen und Zubereitungshilfsmittel enthalten, wie Suspendier-, Stabilisier- und/oder Dispersionsmittel, und/oder Mittel zur Einstellung der Tonizität der Lösung.

Methylxanthine besitzen sowohl als cyclische Nukleotid-Phosphodiesterase(PDE)-Inhibitoren als auch Adenosin-Rezeptorantagonisten eine lange Geschichte. Der Mangel an Selektivität dieser Verbindungen legt eine Beziehung zwischen Strukturdomänen des Adenosin-Rezeptors und der

- 11 -

Phosphodiesterase-Isoenzyme nahe. Die vorliegenden Daten erstrecken die bestehenden Ähnlichkeiten auf das Enzym Adenosindeaminase (Adenosinaminohydrolase, EC 3.5.4.4) (ADA), indem sie zeigen, daß der synthetische Adenosindeaminase-Inhibitor Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)-adenin (EHNA) auch ein starker, und soweit lösliche Phosphodiesterasen betroffen sind, selektiver Inhibitor der cGMP-stimulierten PDE-II-Isoenzyme aus Schweine- und Menschen-Myokard ist. Da sich lösliche und membranständige PDE-Isoenzyme in ihren Eigenschaften sehr ähneln, ist mit Sicherheit zu erwarten, daß die an löslichen Phosphodiesterasen gewonnenen Ergebnisse auch für die membranständigen Enzyme gelten.

MATERIAL UND METHODEN

EHNA-HCl wurde von Burroughs - Wellcome Co. (Greenville, NC, USA) bezogen. c[8-³H]AMP und c[8-³H]GMP wurden vom Radiochemical Centre (Amersham, UK) bezogen. Calmodulin stammte von Boehringer (Mannheim, BRD) und DEAE Sepharose CL-6B und Papaverin stammten von Sigma (Deisenhofen, BRD). Alle anderen Chemikalien stammten von Merck (Darmstadt, BRD) und waren mindestens analysenrein. Hochreines Wasser wurde mit dem Milli-Q-Wasserreinigungssystem (Millipore Corp., Eschborn, BRD) erzeugt. Frische Stammlösungen der Inhibitoren wurden unter gedämpftem Licht mindestens täglich hergestellt.

Quelle des Gewebes, Extraktion und Chromatographie

Proben der linken ventrikulären Papillar-Muskeln wurden mit Zustimmung der Patienten, die sich einem Austausch einer Mitralklappe im Universitäts-Krankenhaus Gießen, BRD, unterzogen, erhalten. Die Myokard-Proben vom Schwein (männliche Schweine der Deutschen Landrasse, 25 bis 30 kg Körpergewicht) wurden nach Exzision der Herzen unter Nembutal-

Anaesthesia erhalten. Die Proben wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und wurden dann in einer Hochgeschwindigkeitsmühle pulverisiert und in flüssigem Stickstoff vorgekühlt. Das gefrorene Gewebspulver wurde durch ein Sieb aus rostfreiem Stahl (-196°C) (Porengröße: 0,315 mm) in einen Homogenisierungspuffer (4°C) (1 ml pro 100 mg Pulver), bestehend aus (Endkonzentrationen): 20 mM Bis-Tris, 2 mM EDTA, 5 mM 2-Mercaptoethanol, 2 mM Benzamidin, 50 µM Phenylmethylsulfonylfluorid, 50 mM Natriumacetat, pH 6,5, gegeben. Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Das Homogenat wurde 30 Minuten bei 48.000 g zentrifugiert. 50 ml des Überstands wurden entnommen und auf eine Säule (20 x 1,6 cm) aus DEAE-Sepharose CL-6B, die mit Homogenisierungspuffer vorequilibriert worden war, geladen. Die Säule wurde mit 200 ml Puffer gewaschen, und die PDE-Aktivitäten wurden mit einem linearen Gradienten von 0,05 bis 1 M Natriumacetat in Puffer (Flußzeit des Gradienten: 500 min) eluiert. Die Flussrate betrug 1 ml/min. 5-ml-Fraktionen wurden gewonnen und auf PDE-Aktivität untersucht.

Test auf die PDE-Aktivität und Bestimmung der IC₅₀-Werte

Die PDE-Aktivität wurde unter Verwendung von HPLC mit einer Off-Line-Flüssig-Szintillationsspektrometrie gemessen. Das Reaktionsgemisch bestand aus (Endkonzentrationen): 1 µM c[8-³H]AMP oder 1 µM c[8-³H]GMP (9,25 GBq/mmol) (ungefähr 35.000 cpm), 1 µM cGMP (sofern vorhanden), 5 mM MgCl₂, 5 x 10⁻⁷ M bis 10⁻³ M Inhibitor (sofern anwendbar) und 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, in einem Gesamtvolumen von 200 µl. Die Enzymaktivität wurde bei 25°C mit 10minütigen Inkubationen gemessen. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 50 µl Enzymlösung gestartet und durch Injektion von 20 µl 60%ige Perchlorsäure beendet. Aliquote zu 20 µl der sauren Überstände wurden angesaugt und in ein automatisiertes HPLC-System (Säule LiChrospher RP-18e) (250 x 4 mm; 5 µm Packung) injiziert.

Die radioaktiven Substrate und die Produkte der PDE-Reaktion wurden unter Verwendung eines RACKBETA 1219-Flüssig-Szintillationszählers (LKB Wallac, Freiburg, BRD) quantitativ bestimmt. Die IC_{50} -Werte (Konzentrationen mit 50%iger Inhibition) wurden bei 1 μ M cAMP oder cGMP unter Verwendung der Peak-Fraktionen bestimmt. Die Daten wurden mit Hilfe der sigmoidalen logistischen Funktion mit vier Parametern gefit- tet.

ERGEBNISSE

Die löslichen PDE-Isoenzyme aus Schweine- und Menschen-Myokard wurden durch Anionenaustauschchromatographie unter Verwendung von DEAE-Sepharose CL-6B aufgetrennt. Die Enzymaktivitäten wurden mit PDE I bis IV gemäß der Nomenklatur nach J.A. Beavo und D.H. Reifsnyder bezeichnet. Die PDE II-Aktivität wurde durch cGMP (1 μ M) stimuliert. Das Enzym wurde dosisabhängig durch 2-o-Propoxyphenyl-8-azapurin-6-on [IC_{50} : 8×10^{-6} M (PDE I), 3×10^{-5} M (PDE II)] inhibiert.

Jedoch fehlte dem Schweine-Myokard die Ca^{2+} -Calmodulin-stimulierte lösliche PDE I-Aktivität. EHNA zeigte eine konzentrationsabhängige Inhibition des cytosolischen cGMP-stimulierten PDE II-Isoenzyms aus menschlichem Myokard ($IC_{50} = 8 \times 10^{-7}$ M). Bezogen auf die anderen löslichen PDE-Isoenzyme war die Inhibition des cGMP-stimulierten PDE II-Subtyps selektiv und in hohem Maße konzentrationsabhängig. Die Inhibition der PDE-Isotypen I, III und IV begann bei einer Konzentration an EHNA, die das cGMP-stimulierte Enzym zu mehr als 99% inhibierte. Die erhaltenen Ergebnisse sind in der beigefügten Figur dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen, daß EHNA als Inhibitor des Enzyms aktiver als der nichtselektive PDE-Inhibitor Papaverin ($IC_{50} = 2 \times 10^{-4}$ M) auf einer molaren Basis war. Es wurde auch gefun-

den, daß EHNA die lösliche cGMP-stimulierte PDE II aus Schweine-Myokard dosisabhängig ($IC_{50} = 2 \times 10^{-6} M$) inhibierte. Die Inhibition der anderen cyclische-Nukleotid-Phosphodiesterasen aus Schweine-Myokard war vernachlässigbar ($IC_{50} > 100 \mu M$).

DISKUSSION

Bis jetzt wurden vier lösliche cyclische-Nukleotid-Phosphodiesterase-Isoenzyme aus Säuger-Myokard unter Verwendung von Anionenaustauschchromatographie aufgetrennt. Diese Enzyme können nach ihren regulatorischen Eigenschaften, d.h. der Aktivierung durch cGMP oder Ca^{2+} -Calmodulin oder die Inhibition durch cGMP oder pharmakologische Inhibitoren unterschieden werden. Selektive Inhibitoren waren für die Ca^{2+} -Calmodulin-stimulierte PDE I, die cGMP-inhibierte PDE III und die Rolipram-sensitive PDE IV verfügbar. Jedoch waren bis jetzt selektive Inhibitoren der cGMP-stimulierten Isoenzyme nicht verfügbar. In der vorliegenden Anmeldung wird erstmals gezeigt, daß der reversible Adenosindeaminase-Inhibitor EHNA ein starker Inhibitor der cytosolischen PDE II aus Schweine- und Menschen-Myokard ist. Bezogen auf die anderen löslichen PDE's war die Inhibition selektiv für das cGMP-stimulierte Isoenzym (vgl. die Figur) mit einem IC_{50} -Wert von $8 \times 10^{-7} M$ (Mensch) oder $2 \times 10^{-6} M$ (Schwein). Diese Daten zeigen strukturelle Ähnlichkeiten der katalytischen und/oder regulatorischen Domänen der zwei offensichtlich nicht verwandten Enzyme Adenosindeaminase und cGMP-stimulierte cyclische-Nukleotid-Phosphodiesterase.

Adenosindeaminase katalysiert die Desaminierung von Adenosin, 2'-Desoxyadenosin und von verschiedenen der anderen cytotoxischen Adenosin-Analogen. Kompetitiv gehemmt wird dieses Enzym durch die synthetische Verbindung Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)-adenin (EHNA). Bei EHNA ist der Riboserest

von Adenosin durch eine aliphatische Kette ersetzt. Die Inhibierung von ADA erfolgt in zwei Stufen, bei denen das 6-NH₂-Desaminierungsziel von EHNA nicht betroffen ist. Der anfängliche Bindungsschritt ist schnell und gehorcht einer klassischen kompetitiven Inhibierung ($K_i = 2 \times 10^{-7} M$), was wahrscheinlich mit einer Bindung der Nonyl-Seitenkette an eine hydrophobe Region in Nachbarschaft zu der katalytischen Stelle von ADA verbunden ist. Dann erfolgt eine anschließende Umordnung entweder des Inhibitors oder des Enzyms, was zu einem festen Enzym-Inhibitor-Komplex (gesamte Inhibierungs-konstante $1,7 \times 10^{-9} M$) führt, aus dem der Inhibitor nur langsam abdissoziiert. Die Inhibierungskonstante des ersten Bindungsschritts war niedriger als der K_m -Wert für das Substrat Adenosin ($K_m = 2 \times 10^{-5} M$), aber war überraschenderweise vergleichbar dem IC_{50} -Wert für die Inhibierung der cGMP-stimulierten PDE in der vorliegenden Untersuchung. Folglich besitzen Dosen von größer als $10^{-7} M$ EHNA inhibierende Wirkungen auf beide Enzyme.

Im Handel erhältliches EHNA, das bei der vorliegenden Untersuchung verwendet wurde, ist ein racemisches Gemisch aus Erythro-(+)-9-(2S-hydroxy-3R-nonyl)-adenin und Erythro-(--)-9-(2R-hydroxy-3S-nonyl)-adenin [(±)-EHNA]. Der K_i -Wert von (±)-EHNA bei menschlicher ADA wurde zu 4 nM bestimmt, was etwa dem 2fachen Wert von (+)-(2S,3R)-EHNA entspricht. Jedoch wurden viel höhere Konzentrationen an EHNA tatsächlich benötigt, um ADA in intakten Zellen zu inhibieren.

Die cGMP-stimulierte PDE ist eines von mindestens zwei löslichen Isoenzymen, die die beiden Second Messenger-Moleküle, cAMP und cGMP, spalten. Die Fähigkeit dieses Enzyms, cAMP oder cGMP zu hydrolysieren, wird in Gegenwart von cGMP infolge allosterischer Aktivierung des Enzyms erhöht, wodurch es zu einem Rezeptor für cGMP wird. Jedoch ist die genaue physiologische Funktion dieses Enzyms immer noch

- 16 -

nicht bekannt. Die vorliegenden Ergebnisse legen eine wichtige Rolle der cGMP-stimulierten PDE bei der Kontrolle des Herzrhythmus nahe.

PDE-II-Inhibitoren wie EHNA erweisen sich als Prototyp-Arzneimittel mit inhibierenden Wirkungen sowohl auf Adenosindeaminase als auch auf cGMP-stimulierte PDE. Im Gegensatz dazu ist 2-o-Propoxyphenyl-8-azapurin-6-on ein selektiver PDE-Hemmstoff, der die Adenosindeaminase nicht inhibiert.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1Tabletten für die orale VerabreichungA. Direkte Kompression

(1)

Wirkstoff: EHNA	2 mg/Tablette
Magnesiumstearat BP	0,65 mg/Tablette
wasserfreie Lactose	80 mg/Tablette

Der Wirkstoff wird mit der wasserfreien Lactose und dem Magnesiumstearat vermischt, und das Gemisch wird gesiebt. Das entstehende Gemisch wird zu Tabletten unter Verwendung einer Tablettiermaschine verpreßt.

Die gleiche Formulierung kann auch mit 2-o-Propoxyphenyl-8-azapurin-6-on als Wirkstoff vorgenommen werden. Gegebenenfalls wird ein Aktivator der Guanylzyklase hinzugefügt.

(2)

Wirkstoff: EHNA	2,5 mg/Tablette
Magnesiumstearat BP	0,7 mg/Tablette
mikrokristalline Cellulose NF	100 mg/Tablette

Der Wirkstoff wird gesiebt und mit der mikrokristallinen Cellulose und dem Magnesiumstearat vermischt. Das entstehende Gemisch wird unter Verwendung einer Tablettiermaschine zu Tabletten verpreßt.

Die gleiche Formulierung kann auch mit 2-o-Propoxyphenyl-8-azapurin-6-on als Wirkstoff vorgenommen werden. Gegebenenfalls wird ein Aktivator der Guanylzyklase hinzugefügt.

B. Nasse Granulierung

Wirkstoff: EHNA	30,0 mg/Tablette
Lactose BP	150,0 mg/Tablette
Stärke BP	30,0 mg/Tablette
vorgelatinisierte Maisstärke BP	15,0 mg/Tablette
Magnesiumstearat BP	1,5 mg/Tablette

Der Wirkstoff wird durch ein geeignetes Sieb gesiebt und mit der Lactose, der Stärke und der vorgelatinisierten Maisstärke vermischt. Geeignete Volumina an gereinigtem Wasser werden zugegeben, und das Pulver wird granuliert. Nach dem Trocknen wird das Granulat gesiebt und mit dem Magnesiumstearat vermischt. Das Granulat wird dann unter Verwendung von Lochstanzen mit geeignetem Durchmesser zu Tabletten verpreßt.

Die gleiche Formulierung kann auch mit 2-o-Propoxyphenyl-8-azapurin-6-on als Wirkstoff vorgenommen werden. Gegebenenfalls wird ein Aktivator der Guanylzyklase hinzugefügt.

Tabletten anderer Zusammensetzung können hergestellt werden, indem man das Verhältnis von Wirkstoff zu Lactose oder das Kompressionsgewicht ändert und entsprechende Lochstanzen verwendet.

Beispiel 2Kapseln

Wirkstoff: EHNA	30 mg/Tablette
freifließende Stärke	150 mg/Tablette
Magnesiumstearat BP	1 mg/Tablette

Der Wirkstoff wird gesiebt und mit den anderen Bestandteilen vermischt. Das Gemisch wird unter Verwendung einer geeigneten Vorrichtung in Hartgelatinekapseln Nr. 2 gefüllt. Andere Kapseln können hergestellt werden, indem man das Füllgewicht ändert und erforderlichenfalls die Kapselgröße entsprechend ändert.

Die gleiche Formulierung kann auch mit 2-o-Propoxyphenyl-8-azapurin-6-on als Wirkstoff vorgenommen werden. Gegebenenfalls wird ein Aktivator der Guanylzyklase hinzugefügt.

Beispiel 3

Injectio für intravenöse Verabreichung

Wirkstoff: EHNA 1,5 - 3,0 mg/ml

Natriumchlorid-intravenöse

Infusion, BP, 0,9 % Gew./Vol. 1 ml

Ansatzgröße 2500 ml

Der Wirkstoff wird in einem Teil der Natriumchlorid-intravenösen Infusion gelöst, die Lösung mit der Natriumchlorid-intravenösen Infusion auf das Volumen eingestellt und die Lösung gründlich vermischt. Die Lösung wird in klare, Typ 1, 10-ml-Glasampullen eingefüllt und unter Stickstoff im Kopfraum durch Abschmelzen des Glases abgesiegelt. Die Ampullen werden durch Erhitzen im Autoklaven bei 120°C für nicht kürzer als 20 Minuten sterilisiert.

P A T E N T A N S P R Ü C H E

1. Arzneimittel, dadurch gekennzeichnet, daß es einen oder mehrere Inhibitoren für die cGMP-stimulierte Phosphodiesterase (PDE II) zusammen mit üblichen Trägerstoffen und/oder Verdünnungsmitteln enthält.
2. Arzneimittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es als Inhibitor Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)-adenin oder 2-o-Propoxyphenyl-8-azapurin-6-on enthält.
3. Arzneimittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es zusätzlich einen oder mehrere Aktivatoren der Guanylzyklase enthält.
4. Arzneimittel nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß es in einer für die orale, intraperitoneale, intramuskuläre, subkutane, intraartikuläre oder intravenöse Verabreichung geeigneten Form vorliegt.
5. Arzneimittel nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß es in Form von Tabletten, Dragees, Kapseln, Lösungen oder in einer für die Injektion oder Infusion geeigneten Form vorliegt.
6. Arzneimittel nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß es als Depotform vorliegt.
7. Verwendung von Inhibitoren der cGMP-stimulierten Phosphodiesterase (PDE II) für die Bekämpfung und Prophylaxe von Herz-Kreislauf-Erkrankungen.

8. Verwendung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)-adenin oder 2-o-Propoxyphenyl-8-azapurin-6-on verwendet wird.

9. Verwendung nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Verwendung zusammen mit einem oder mehreren Aktivatoren der Guanylzyklase erfolgt.

10. Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 7 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Verwendung gleichzeitig, getrennt oder zeitlich abgestuft erfolgt.

11. Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 7 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Verwendung bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen erfolgt.

12. Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 7 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Verwendung oral, intraperitoneal, intramuskulär, subkutan, intraartikulär oder intravenös erfolgt.

13. Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 7 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Verwendung in Form von Tabletten, Dragees, Kapseln, Lösungen oder in einer für die Injektion oder Infusion geeigneten Form erfolgt.

14. Verwendung von Inhibitoren der cGMP-stimulierten Phosphodiesterase (PDE II) zur Herstellung von Arzneimitteln gegen Herz-Kreislauf-Erkrankungen.

15. Verwendung nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)-adenin oder 2-o-Propoxyphenyl-8-azapurin-6-on verwendet wird.

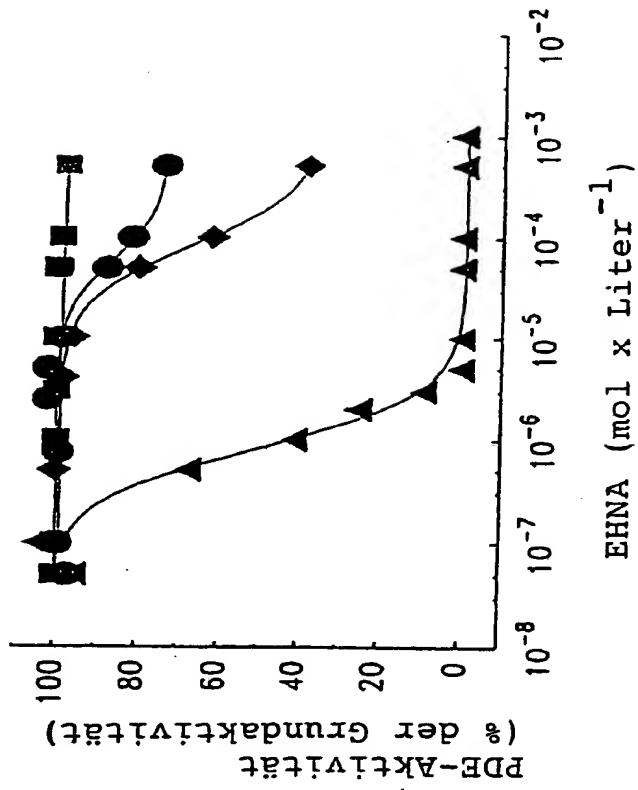
16. Verwendung nach einem der Ansprüche 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Verwendung zusammen mit einem oder mehreren Aktivatoren der Guanylzyklase erfolgt.

17. Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 13 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß für die orale, intraperitoneale, intramuskuläre, subkutane, intraartikuläre oder intravenöse Verabreichung geeignete Arzneimittel hergestellt werden.

18. Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 13 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß Tabletten, Dragees, Kapseln, Lösungen oder für die Injektion oder Infusion geeignete Präparate hergestellt werden.

19. Inhibitor für die cGMP-stimulierte Phosphodiesterase (PDE II) zur Verwendung bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen, gegebenenfalls zusammen mit der gleichzeitigen, getrennten oder zeitlich abgestuften Verwendung von einem oder mehreren Aktivatoren der Guanylzyklase.

20. Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)-adenin oder 2-*o*-Propoxy-phenyl-8-azapurin-6-on, gegebenenfalls zusammen mit einem oder mehreren Aktivatoren der Guanylzyklase, zur Verwendung bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen, gegebenenfalls zusammen mit der gleichzeitigen, getrennten oder zeitlich abgestuften Verwendung von einem oder mehreren Aktivatoren der Guanylzyklase.



FIGUR
Konzentrations-Wirkungskurve. Inhibition der einzelnen
cytosolischen PDE-Isoenzyme aus menschlichem Myokard durch
EHNA: PDE I (■), PDE III (●), PDE II (▲), PDE IV
(◆).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 93/00827

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. 5 A61K31/00; A61K31/52
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl. 5 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	J.CARDIOVASC.PHARMACOL. Vol. 5, No. 6, 1983, pages 1040 - 7 see page 1044, right-hand column, line 13 - line 22 see page 1046, left-hand column, line 11 - line 13 see page 1046, left-hand column, line 28 - line 30 -.-	1-20
X	EUR.J.PHARMACOL. Vol. 200, No. 1, 1991, pages 83 - 7 see page 83 see page 87, left-hand column -.-	1-20 -/-

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
5 July 1993 (05.07.93)	20 July 1993 (20.07.93)
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 93/00827

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	J.MED.CHEM. Vol. 18, No. II, 1975, pages 1117 - 22 cited in the application see page 1120, right-hand column, line 9 - line 12	1-6 19-20
X	J.PHARMACOL.EXP.THER. Vol. 258, No. 3, 1991, pages 972 - 8 see page 974, left-hand column, line 17 - line 26 see page 977, right-hand column, line 16 - line 19	1-20
X	J.PHARMACOL.EXP.THER. Vol. 249, No 2, 1989, pages 394 - 400 see page 395, left-hand column, line 5 - line 7 see page 396, right-hand column, line 17 - page 397, left-hand column, line 4	1-20
X	EP,A,0 463 756 (PFIZER) 2 January 1992 see page 3, line 1 - line 14 see page 7, line 3 - line 8	1,7,14
A	TIPS REVIEW Vol. 11, 1990 pages 150 - 5 cited in the application	1-20
A	J.MOL.CELL.CARDIOL. Vol. 23, No. SPLV, 1991, pages ABSTR. - P217 cited in the application	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 93/00827

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
REMARK : Although claims 7-13, 17,18 are directed to a method of treatment of (diagnostic method practised on) the human/animal body the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/compositi
2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.

EP 9300827
SA 72458

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 05/07/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP-A-0463756	02-01-92	AU-B-	626757	06-08-92
		AU-A-	7915591	19-03-92
		CN-A-	1057464	01-01-92

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Patentamt

PCT/EP 93/00827

I. KLASSEFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassefikationsymbolen sind alle anzugeben)⁴

Nach der internationales Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassefikation und der IPC

Int.Kl. 5 A61K31/00; A61K31/52

II. RECHERCHIERTE SACHGEBiete

Recherchierte Mindestpräzisität⁷

Klassefikationssystem	Klassefikationssymbol
Int.Kl. 5	A61K

Recherchierte nicht zum Mindestpräzisität gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen⁸III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN⁹

Art. ¹⁰	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³
X	J.CARDIOVASC.PHARMACOL. Bd. 5, Nr. 6, 1983, Seiten 1040 - 7 siehe Seite 1044, rechte Spalte, Zeile 13 - Zeile 22 siehe Seite 1046, linke Spalte, Zeile 11 - Zeile 13 siehe Seite 1046, linke Spalte, Zeile 28 - Zeile 30 ----	1-20
X	EUR.J.PHARMACOL. Bd. 200, Nr. 1, 1991, Seiten 83 - 7 siehe Seite 83 siehe Seite 87, linke Spalte ----	1-20 -/-

¹⁰ Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen¹⁰:

- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam angesehen ist
- "B" älteres Dokument, das jedoch erst aus oder nach dem internationales Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie zugesagt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine natürliche Offenlegung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationales Anmeldedatum, aber nach dem beispielhaften Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationales Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht konsistent, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfundener Tätigkeit beruhend betrachtet werden

- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfundener Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann unkliegend ist

- "A" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

IV. BESCHEINIGUNG

1 Datum des Abschlusses der internationales Recherche 05.JULI 1993	Abschlußdatum des internationales Recherchenberichts 27.07.1993
Internationale Recherchenbehörde EUROPAISCHES PATENTAMT	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten GERLI P.F.M.

III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		
Art	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Rez. Anspruch Nr.
X	J.MED.CHEM. Bd. 18, Nr. II, 1975, Seiten 1117 - 22 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 1120, rechte Spalte, Zeile 9 - Zeile 12 ----	1-6, 19-20
X	J.PHARMACOL.EXP.THER. Bd. 258, Nr. 3, 1991, Seiten 972 - 8 siehe Seite 974, linke Spalte, Zeile 17 - Zeile 26 siehe Seite 977, rechte Spalte, Zeile 16 - Zeile 19 ----	1-20
X	J.PHARMACOL.EXP.THER. Bd. 249, Nr. 2, 1989, Seiten 394 - 400 siehe Seite 395, linke Spalte, Zeile 5 - Zeile 7 siehe Seite 396, rechte Spalte, Zeile 17 - Seite 397, linke Spalte, Zeile 4 ----	1-20
X	EP,A,0 463 756 (PFIZER) 2. Januar 1992 siehe Seite 3, Zeile 1 - Zeile 14 siehe Seite 7, Zeile 3 - Zeile 8 ----	1,7,14
A	TIPS REVIEW Bd. 11, 1990, Seiten 150 - 5 in der Anmeldung erwähnt ----	1-20
A	J.MOL.CELL.CARDIOL. Bd. 23, Nr. SPLV, 1991, Seiten ABSTR. - P217 in der Anmeldung erwähnt -----	1-20

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Attestat

PCT/EP 93/00827

Feld I: Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht rech�ierbar erweisen haben (Fortsetzung von Punkt I auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2a)) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprache Nr. weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu denen Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Obwohl die Ansprüche 7-13, 17, 18 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des M menschlichen/tierischen Körpers (Diagnostizierverfahren, das an menschliche n/tierischen Körper vorgenommen wird), beziehen, wurde die Recherche durchgeführt, UND GEÜNDET SICH AUF DIE ANGELÜNTENEN WIRKUNGEN DER VERBINDUNG/
2. Ansprache Nr. weil sie sich auf Teile der internationale Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
ZUSAMMENSETZUNG
3. Ansprache Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgedeckt sind.

Feld II: Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchebehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle rech�ierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. Da für alle rech�ierbaren Ansprüche die Recherche einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die internationale Recherchebehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet werden sind, nämlich auf die Ansprache Nr.
4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen sonst erwähnte Erfindung; dies ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

Die zusätzlichen Gebühren werden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
 Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

**ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT
ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.**

**EP 9300827
SA 72458**

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am

Diese Angaben dienen nur zur Orientierung und erfolgen ohne Gewähr.

05/07/93

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A-0463756	02-01-92	AU-B- 626757	06-08-92
		AU-A- 7915591	19-03-92
		CN-A- 1057464	01-01-92